

# Rozpoznawanie gruźlicy u bydła

Jerzy Kita<sup>1</sup>, Krzysztof Anusz<sup>2</sup>

z Katedry Nauk Klinicznych<sup>1</sup> i Katedry Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego<sup>2</sup>  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Milowym krokiem w zwalczaniu gruźlicy bydła i innych gatunków zwierząt stała się możliwość przyżyciowego wykrywania zakażenia prątkiem *Mycobacterium bovis*. Zakażenie bydła tym drobnoustrojem ma zwykle przebieg podkliniczny lub przewlekły. Bydło może być zakażone przez dłuższy czas zanim pojawią się objawy kliniczne lub zmiany gruźlicze, ale nawet pojawienie się objawów chorobowych nie jest patognomoniczne dla gruźlicy. Przyżyciowa diagnostyka gruźlicy bydła musi więc opierać się na metodach pozwalających na wczesne wykrycie zakażenia.

*Mycobacterium bovis* jest drobnoustrojem wewnątrzkomórkowym namnażającym się głównie w makrofagach. W odpowiedzi immunologicznej na zakażenie bydła *M. bovis* decydującą rolę odgrywają limfocyty T (1). Odporność komórkowa w przebiegu gruźlicy spełnia dwie funkcje – ochronną i wywołującą przewlekłe zapalenie – prowadzące do powstawania charakterystycznych dla tej choroby ziarniniaków. Jedynie zaawansowany proces gruźliczy charakteryzujący się rozległymi zmianami lub doświadczalne zakażenie dużymi dawkami *M. bovis* prowadzą

do pojawienia się wysokiego miana przeciwciał we krwi (2, 3). W związku z tym jedynie badania opierające się na ocenie komórkowej odpowiedzi immunologicznej pozwalają na wczesną identyfikację zakażonych zwierząt, a ich czułość jest znacznie większa niż testów wykrywających przeciwciała.

Unia Europejska do przyżyciowej diagnostyki gruźlicy bydła zatwierdziła dwa testy – śródskórny test tuberkulinowy oraz test immunoenzymatyczny służący do wykrywania interferonu  $\gamma$  (test gamma-interferonowy) uwalnianego *in vitro* przez leukocyty krwi po stymulacji tuberkuliną (test z użyciem pełnej krwi; 4).

W krajach, które realizują program zwalczania gruźlicy bydła rutynowym testem jest śródskórny test tuberkulinowy, nazywany również testem skórnym. Test ten jest zalecany również przez Światową Organizację Zdrowia Zwierząt (OIE), jako przyżyciowa metoda diagnostyczna gruźlicy bydła

## Diagnosis of tuberculosis in cattle

Kita J.<sup>1</sup>, Anusz K.<sup>2</sup>, Department of Clinical Sciences<sup>1</sup>, Department of Food Hygiene and Veterinary Public Health<sup>2</sup>, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

The aim of this paper was to present diagnostic methods applicable for tuberculosis (TB) in cattle. Tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon test and serological methods were described. Evaluation of single and comparative tuberculin tests as well as their positive and negative results in the context of false positive and negative reactions was discussed. Interferon  $\gamma$  assay was described and its diagnostic value was compared with traditional tuberculin test. Currently available methods for bovine TB diagnosis do not allow however, the precise recognition of *M. bovis* status in an animal. The European Union recommends two methods of ante-mortem TB diagnosis in cattle: intradermal tuberculin test and  $\gamma$ -interferon release by peripheral lymphocytes, estimated by ELISA test.

**Keywords:** tuberculosis, cattle, tuberculin test,  $\gamma$ -interferon test, diagnosis.

w handlu międzynarodowym. Test śródskórny sprawdził się w praktyce, ale wciąż poszukuje się nowych metod przyżyciowej diagnostyki gruźlicy. Program zwalczania gruźlicy bydła opiera się na regularnym wykonywaniu testu skórnego u wszystkich zwierząt w kraju, eliminowaniu reagujących dodatnio oraz ograniczeniu obrotu zwierząt ze stad zakażonych. Większość krajów europejskich jest wolna od gruźlicy bydła. Ostatnio Polska również została oficjalnie uznana przez Unię Europejską za wolną od gruźlicy bydła<sup>1</sup>. W niektórych krajach na przeskodzie uwolnienia od gruźlicy stoi rezerwuar *M. bovis* w postaci zwierząt wolno żyjących (5, 6).

Stosowanie przez lata śródskórnego testu tuberkulinowego ujawniło, że może on dawać wyniki fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne. To legło u podstaw opracowania testu gamma-interferonowego, jako próby uzupełniającej śródskórny test tuberkulinowy. Obie te metody stosowane w diagnostyce przyżyciowej przyczyniły się do zwiększenia wykrywalności zakażonych zwierząt, szczególnie w ostatnim etapie zwalczania gruźlicy bydła, zarówno w przypadku niskiego, jak i wysokiego odsetka reakcji nieswoistych w teście skórnym.

Inne metody diagnostyki przyżyciowej, takie jak test ELISA do wykrywania przeciwciał przeciwko *M. bovis* (7), test transformacji limfocytów, test fluorescencyjny do wykrywania przeciwciał (8) i tzw. elektroniczny nos („electronic nose”; 9) nie znalazły praktycznego zastosowania.

## Śródskórny test tuberkulinowy (test skórnym)

W wielu krajach uprzemysłowionych walkę z gruźlicą bydła rozpoczęto w XIX wieku. Początkowo zwalczanie opierało się na badaniu klinicznym i bakteriologicznym mleka w stadach bydła mlecznego oraz dobrowolnym eliminowaniu chorych zwierząt. W Wielkiej Brytanii narodowy program zwalczania gruźlicy, oparty na śródskórnym teście tuberkulinowym, usuwaniu zwierząt reagujących dodatnio i kontroli obrotu zwierzętami zaczął obowiązywać dopiero od 1950 r. Program ten był realizowany i stopniowo poszerzany na obszarach o największej liczbie stad zbadanych dobrowolnie W październiku 1960 r. objęto nim już cały kraj. W latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku osiągnięto historyczne minimum występowania przypadków gruźlicy bydła. Liczba eliminowanych zwierząt reagujących dodatnio w śródskórnym teście tuberkulinowym podlegała znacznym wahaniom. Na przykład w 1961 r. wynosiła 16 984, a w 1979 r. spadła do 633 zwierząt. W tym samym okresie liczba reagentów dodatnich we wszystkich badanych stadach spadała z 3,5 do 0,49%. Jednak w południowej Anglii występowanie gruźlicy bydła było trzykrotnie wyższe, co utrudniło realizację programu zwalczania. Zwracano wówczas uwagę na borsuki (*Meles meles*) jako możliwy rezerwuar prątków typu bydłowego (10).

Śródskórny test tuberkulinowy jest międzynarodowym standardem przyżyciowego rozpoznawania gruźlicy bydła w stadzie, jak również u poszczególnych zwierząt. Oparty jest na występowaniu u zakażonego zwierzęcia miejscowej reakcji nadwrażliwości późnej po śródskórnej iniekcji tuberkuliny. Tuberkulina jest białkiem pochodzącym ze ściany komórkowej prątków. Obecność tego białka przyczynia się do stymulacji limfocytów T, które za pośrednictwem wydzielanych cytokin powodują przede wszystkim napływ komórek jednojądrzastych – makrofagów i limfocytów oraz neutrofilów. Robert Koch, który pierwszy uzyskał tuberkulinę, bez powodzenia stosował ją jako szczepionkę przeciwko gruźlicy u ludzi. Dopiero później została wykorzystana do diagnostyki gruźlicy u ludzi i zwierząt.

Obecnie tuberkulina bydłowa produkowana jest ze szczepu *M. bovis* AN5 izolowanego w Anglii około 1948 r. i wyselekcjonowanego do optymalnego wzrostu *in vitro* (11). Tuberkulinę ptasią otrzymuje się ze szczepu *M. avium* subsp. *avium*, a ludzką ze szczepu *M. tuberculosis*. Tuberkulina wstrzyknięta śródskórnie zwierzęciu, które nie jest na nią uczulone, a więc nie jest

zakażone prątkami, nie powoduje powstania miejscowej odpowiedzi o cechach zapalenia. Wstrzyknięta zwierzęciu, którego układ immunologiczny został uczulony przez zakażenie *M. bovis* lub przez kontakt z czynnikami zakaźnymi mającymi antygeny reagujące krzyżowo z antygenami prątków bydłowych, wywołuje miejscową reakcję zapalną wyrażającą się obrzękiem, najsilniejszym 48–72 godziny po iniekcji. Późna reakcja nadwrażliwości na tuberkulinę jest modulowana przez populację uczulonych limfocytów T, a jej powstanie wymaga odpowiedniego czasu od zakażenia (najczęściej kilka tygodni).

Technika wykonania śródskórnego testu tuberkulinowego u bydła jest dobrze znana lekarzom weterynarii i opisana w urzędowej instrukcji. Warto jednak przypomnieć, że zasady tego testu dla bydła zostały oparte na teście opracowanym w 1908 r. przez francuskiego lekarza Charlesa Mantoux do diagnostyki zakażeń *M. tuberculosis* u ludzi (12).

Interpretacja wyniku obecnie wykonywanej tuberkulinizacji porównawczej została oparta na obserwacji, że w przebiegu zakażenia *M. bovis* występuje silniejsza reakcja miejscowa na tuberkulinę prątką bydłowego niż na tuberkulinę prątką ptasiego. Zakażenia prątkami niepatogennymi mogą również prowadzić do wystąpienia dodatnich odczynów nieswoistych (fałszywie dodatnich). Tak, więc śródskórny test tuberkulinowy pozwala na różnicowanie zakażeń *M. bovis* i *M. avium* lub prątkami niepatogennymi (13). W USA, Kanadzie, Nowej Zelandii i Australii tuberkulinę wstrzykuje się do fałdu ogonowego, a na kontynencie europejskim w skórę szyi. W niektórych krajach w miejsce śródskórnego testu tuberkulinowego stopniowo wprowadza się test gamma-interferonowy (14, 15).

## Wartość diagnostyczna śródskórnego testu tuberkulinowego

Wartość śródskórnego testu tuberkulinowego została określona na podstawie analizy statystycznej, czułości i swoistości u zwierząt zakażonych i niezakażonych. Należy jednak pamiętać, że na diagnostykę gruźlicy ma wpływ zarówno okres choroby, jak i rozległość zmian gruźliczych, występowanie reakcji krzyżowych (nieswoistych) oraz inne różnorodne czynniki ze strony zwierzęcia (16). Przyczyny wyników fałszywie ujemnych próby tuberkulinowej zestawiono w tabeli 1.

Nowo zakażone zwierzęta na ogół nie reagują w śródskórnym teście tuberkulinowym, bowiem nadwrażliwość na tuberkulinę u bydła pojawia się zwykle dopiero pomiędzy 1 a 9 tygodniem po zakażeniu

<sup>1</sup> Stało się to na mocy decyzji Komisji 209/342/EC z 23 kwietnia 2009 r.

*M. bovis*, w zależności od osobniczych cech zwierzęcia i okoliczności wykonania testu. Jednak u większości zwierząt test ten jest dodatni pomiędzy 3 a 6 tygodniem po zakażeniu (17). Przeprowadzone w ostatnich latach badania na cielętach zakażonych donosowo *M. bovis* wykazały, że zwierzęta reagowały na śródskórnie podaną tuberkulinę po 3 tygodniach od zakażenia. Spośród 20 cieląt poddanych tuberkulinizacji przed i po zakażeniu, u 19 wynik śródskórnego testu tuberkulinowego był dodatni również wtedy, kiedy poddawano je ponownej tuberkulinizacji po 4, 6, 7, 8 lub 9 tygodniach. Tylko jedno cielę z grupy doświadczalnej pozostało ujemne po 4 tygodniach (dodatni odczyn tuberkulinowy wystąpił dopiero po 63 dniach). W innych doświadczeniach stwierdzono brak korelacji pomiędzy dawką zakażenia a czasem rozwoju reakcji śródskórnej na tuberkulinę (18). Wykazano natomiast, że występuje związek pomiędzy wielkością reakcji skórnej a rozległością zmian patologicznych stwierdzanych w badaniu pośmiertnym (19).

Zjawisko anergii czyli braku reaktywności może wystąpić w przypadku zaawansowanej gruźlicy i jest dobrze znane lekarzom praktykom. Także po porodzie, w ciągu 4 do 6 tygodni, u krowy chorej na gruźlicę wynik testu tuberkulinowego może być ujemny. Podanie glikokortykosteroidów zwierzętom zakażonym *M. bovis* również zmniejsza reakcję tuberkulinową. U zwierząt jednocześnie zakażonych *M. bovis* i np. immunosupresyjnie działającym wirusem biegunki bydła (BVD) stwierdza się poważne upośledzenie aktywności limfocytów i makrofagów. Konsekwencją tego może być okresowo ujemny wynik tuberkulinizacji (20). Także stany niedoborów pokarmowych przyczyniają się do osłabienia komórkowej odpowiedzi immunologicznej (13).

Śródskórne wstrzyknięcie tuberkuliny powoduje, że u zakażonej krowy reakcja skórna po powtórny jej podaniu przez pewien czas jest słabsza. Fenomen ten jest znany jako tzw. desensytyzacja, czyli odczulenie, i może uniemożliwić identyfikację naturalnie zakażonego bydła jako rezerwuaru zarazka. Ten negatywny efekt jest najsilniejszy w ciągu tygodnia po pierwszej iniekcji tuberkuliny (21). Nadwrażliwość skóry na tuberkulinę pojawia się ponownie po około 60 dniach. Dlatego przyjęto, że przerwa pomiędzy poszczególnymi tuberkulinizacjami powinna wynosić przynajmniej 42 dni. Niektórzy autorzy zwracają uwagę, że częste tuberkulinizacje przeprowadzane w stadach, gdzie występują przewlekle zakażone zwierzęta, nie mają znaczącego działania odczulającego (22). Niedawno wykonane badania na cielętach z powtarzaniem testem skórnym przed i po eksperymentalnym zakażeniu *M. bovis* również nie wykazały istotnych zmian w czułości testu (23).

**Tabela 1.** Przyczyny wyników fałszywie ujemnych w teście tuberkulinowym bydła

Przyczyny ze strony zwierząt poddanych tuberkulinizacji
Došlo do odczulenia (desensytyzacji), jeżeli kolejna tuberkulinizacja jest wykonywana w zbyt krótkim czasie po poprzedniej
Jeszcze nie doszło do rozwoju nadwrażliwości – test wykonany zbyt wcześnie po zakażeniu (wczesna faza choroby)
Stan anergii związany z uogólnionym procesem gruźliczym
Jednoczesne zakażenie prątkami śródowiskowymi (np. <i>M. avium-intracellulare</i> complex) prowadzące do nadwrażliwości na tuberkulinę ptasią*
Szczepienie przeciwko <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> *
Zakażenia wirusami immunosupresyjnymi, np. wirusem wirusowej biegunki bydła (BVDV) lub bydłowym wirusem niedoboru odporności (BIV)
Leki (np. kortykosteroidy)
Immunosupresja poporodowa
Nieprawidłowe żywienie lub stres transportowy (?)
Struktura molekularna szczepu <i>M. bovis</i> wywołującego zakażenie (?)
Czynniki związane z tuberkuliną
Upłynęła data ważności tuberkuliny
Tuberkulina niewłaściwie przechowywana (np. narażenie na działanie promieni słonecznych lub wysoką temperaturę)
Błędy w produkcji tuberkuliny (np. niewłaściwy szczep lub błędna standaryzacja)
Czynniki związane z techniką zabiegu lub odczytem
Wstrzyknięcie zbyt małej dawki tuberkuliny
Podanie podskórne zamiast śródskórne
Iniekcja po niewłaściwej stronie szyi (kilkakrotne ukłucia)
Zbyt wczesny lub zbyt późny odczyt (tolerancja $\pm$ 4–6 h)
Błąd w odczycie
Błąd w identyfikacji zwierzęcia
Dokładność badającego

\* przyczyny te mogą również wywoływać odczyn fałszywie dodatnie

Błędy lekarza weterynarii wykonującego tuberkulinizację mogą również wpływać na jej wynik. Niewłaściwe wstrzyknięcie tuberkuliny, zbyt mała jej dawka, zbyt wczesny lub późny odczyt mogą być powodem uzyskania wyniku fałszywie ujemnego. Reakcja tuberkulinowa przy zakażeniu *M. bovis* może być maskowana przez wcześniejsze zakażenie *M. avium*. Wówczas reakcja na tuberkulinę ptasią jest silniejsza (24). W rejonach częstszego występowania zakażeń *M. avium* czy też *M. avium* subsp. *paratuberculosis* może to komplikować diagnostykę przyżyciową. W takiej sytuacji można nie brać pod uwagę reakcji na tuberkulinę ptasią lub stosować jedynie tuberkulinę bydłą. Innym rozwiązaniem jest zastosowanie testu gamma-interferonowego, który ułatwia identyfikację zwierząt zakażonych *M. bovis*.

Ograniczona swoistość śródskórnego testu tuberkulinowego prowadzi zwykle do uzyskania wyników fałszywie dodatnich, określanych często jako odczyn nieswoiste. Reakcje fałszywie dodatnie są najczęściej spowodowane różnymi czynnikami zakaźnymi. Nieswoiste reakcje nadwrażliwości skórnej na tuberkulinę u bydła zostały opisane po naturalnych

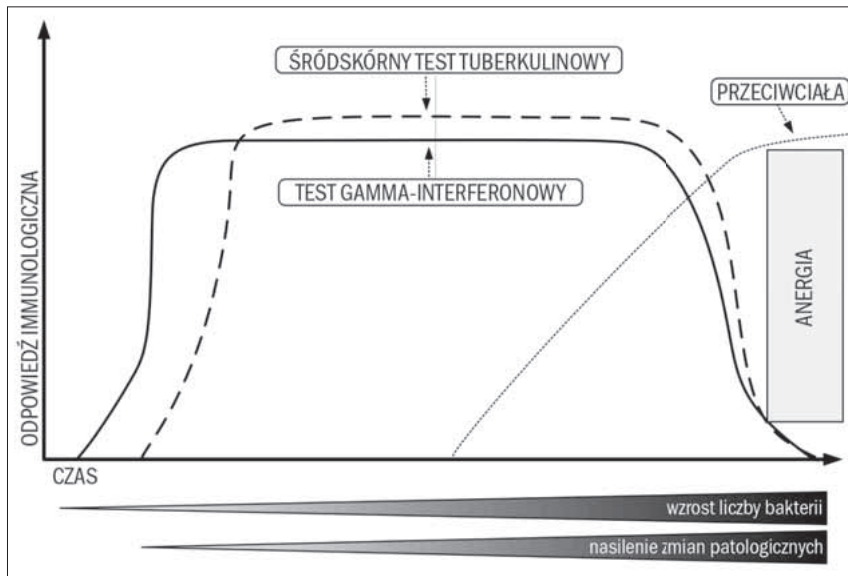
i doświadczalnych zakażeniach lub po szczepieniach z użyciem drobnoustrojów, których białka wykazują podobieństwo do tuberkuliny bydłowej PPD. Reakcja na tuberkulinę bydłą jest jednak silniejsza u bydła zakażonego *M. bovis* lub *M. tuberculosis* (24). W przyszłości odczyn nieswoiste będą eliminowane przez zastąpienie bydłowej tuberkuliny PPD oczyszczonymi antygenami *M. bovis* (25).

Wszystkie zwierzęta, u których odczytano dodatni wynik tuberkulinizacji powinny być poddane badaniu poubojowemu, które w większości przypadków (63,2–100%, średnio 83%) potwierdza ten wynik. Wydaje się, że śródskórny test tuberkulinowy po wstrzyknięciu tuberkuliny do fałdu szyjnego jest bardziej czuły, ale mniej swoisty niż po jej podaniu do fałdu ogonowego.

### Znaczenie podklinicznych zakażeń prątkiem bydłowym u zwierząt reagujących dodatnio w śródskórnym teście tuberkulinowym

W Wielkiej Brytanii, Irlandii i innych krajach około 50 do 80% bydła reagującego dodatnio w teście skórnym nie wykazuje zmian w badaniu poubojowym i nie





Ryc. 1. Schemat przedstawiający związek między odpowiedzią immunologiczną a wynikami testów diagnostycznych w gruźlicy (28)

izoluje się też od tych zwierząt *M. bovis* (26). Przyczynia się to do zmniejszenia zaufania zarówno do śródskórnego testu tuberkulinowego, jak i testu gamma-interferonowego. Wielu autorów zwraca uwagę, że badanie poubojowe oraz standardowe badanie bakteriologiczne są znacznie mniej czułe niż testy immunologiczne, które często pozwalają na wykrycie zakażenia podklinicznego (27, 28).

Poważnym uchybieniem jest uznawanie zwierząt z dodatnimi wynikami testu tuberkulinowego, ale bez objawów klinicznych i z ujemnymi wynikami badań bakteriologicznych, za wykazujące wynik fałszywie dodatni.

Reakcja dodatnia bez objawów klinicznych może wskazywać na to, że:

- zwierzęta są we wczesnym okresie zakażenia *M. bovis*, a zmiany chorobowe są tak małe lub tak ograniczone, że są niezauważalne, nawet w badaniu pośmiertnym;
- u zwierząt występuje zakażenie latentne, bez objawów, ale z okresowym siewstwem *M. bovis*;
- zwierzęta są niezakażone, ale na skutek narażenia na antygeny środowiskowych prątków niepatogennych, reagują dodatnio na tuberkulinę bydłą lub inne antygeny używane w diagnostyce przyżyciowej.

Tak więc fałszywie dodatnie wyniki u zwierząt, niewykazujących objawów klinicznych, nie świadczą o małej swoistości śródskórnego testu tuberkulinowego. Natomiast wielu autorów zwraca uwagę na zbyt małą czułość tuberkulinizacji porównawczej. Test ten jest zwykle opisywany jako skuteczny w rozpoznaniu choroby w stadzie, ale jako mniej dokładny w rozpoznaniu zakażenia u poszczególnych zwierząt.

### Test gamma-interferonowy

Test ten polega na swoistej stymulacji tuberkuliną PPD *M. bovis* leukocytów krwi obwodowej do syntezy interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ). W teście badana jest pełna krew. Został on opracowany w Australii w latach 80. ubiegłego wieku i jest tam obecnie stosowany do diagnostyki gruźlicy bydła w połączeniu ze śródskórnym testem tuberkulinowym (29, 30). W 1991 r. metoda została uznana za oficjalny test diagnostyczny na terenie Australii, a w późnych latach 90. stała się oficjalnym testem do diagnostyki gruźlicy bydła również w Nowej Zelandii (31).

Test przeprowadza się *in vitro*. Krew należy pobrać na heparynę i jak najszybciej dostarczyć do laboratorium. Test powinien być wykonany w ciągu 28 godzin od pobrania krwi, najlepiej w ciągu 8 godzin. Próbkę pełnej krwi są inkubowane w obecności tuberkuliny PPD bydłowej, tuberkuliny ptasiej oraz antygeny kontrolnego (ujemnego; 14, 15). Po 16–24 godzinach inkubacji w temp. 37°C supernatant (osocze) jest oddzielany i przechowywany do drugiego etapu testu. Próbkę osocza można zamrażać i przechowywać w –20°C. W drugim etapie testem ELISA oznaczana jest koncentracja IFN- $\gamma$  w próbkach.

Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) jest cytokiną uwalnianą głównie przez limfocyty T po stymulacji antygenowej. Interferon ten odgrywa istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej na zakażenie prątkiem gruźlicy. Jest głównym czynnikiem aktywującym makrofagi. Podobnie jak w śródskórnym teście tuberkulinowym, zasadą testu gamma-interferonowego jest ocena odpowiedzi komórkowej gospodarza, będącej odpowiedzią na zakażenie *M. bovis* (25). Już od 1 do 4 tygodni po zakażeniu *M. bovis*

limfocyty T krwi obwodowej bydła uwalniają mieralne ilości IFN- $\gamma$  w odpowiedzi na stymulację tuberkuliną bydłą. Jeśli natomiast zwierzę zostało zakażone *M. avium* lub innymi prątkami środowiskowymi, wówczas uwalnianie IFN- $\gamma$  będzie większe w obecności tuberkuliny ptasiej. Na zakażenie *M. bovis* wskazuje silniejsza stymulacja produkcji interferonu w obecności tuberkuliny bydłowej niż w obecności tuberkuliny ptasiej i antygeny kontrolnego. Określana testem ELISA ilość IFN- $\gamma$  jest wyrażana w jednostkach gęstości optycznej (30).

Test gamma-interferonowy jest dostępny komercyjnie jako Bovigam® (Prionics). Ten sam test jest używany w diagnostyce przyżyciowej gruźlicy kóz, owiec (32), bawołów afrykańskich (33) i może być stosowany u innych gatunków z rodziny Bovidae. Bovigam® nie jest stosowany u innych ssaków. Należy jednak zwrócić uwagę, że podobny test z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych jest stosowany w diagnostyce przyżyciowej gruźlicy u ludzi (QuantIFERON® – TB, Cellestis Ltd, Australia; 34, 35), naczelnych i jeniowatych. Podobny test opracowano do wykrywania IFN- $\gamma$  w limfocytach i pełnej krwi borsuków zakażonych *M. bovis*. Wymaga on jednak dalszej standaryzacji (walidacji i oceny).

### Wartość diagnostyczna testu gamma-interferonowego

Test Bovigam® był oceniany w kilku krajach między innymi w Australii, Brazylii, Etiopii, Wielkiej Brytanii, Irlandii, Włoszech, Nowej Zelandii, Hiszpanii i USA (36). Czułość badanego testu wahała się od 73,0 do 100%, ze średnią wartością 87,6%. Średnia swoistość testu wynosiła 96,6%, z wahaniami od 85,0 do 99,6%. Na wynik testu ma wpływ szereg czynników. Należą do nich: populacja bydła, w której prowadzona jest ocena, różne kryteria odczytu, seria i producent tuberkuliny.

Powszechnie uważa się, że czułość testu wykrywającego interferon-gamma jest zbliżona do czułości śródskórnego testu tuberkulinowego. Test ten wykrywa jednak pewną liczbę zakażonych zwierząt, których nie wykryto w teście tuberkulinowym (25). Wynika to z obecności IFN- $\gamma$  we krwi zwierząt we wczesnym okresie zakażenia prątkami. Należy jednak podkreślić, że wyniki obydwu testów różnią się nieznacznie.

Tak więc wynik ujemny śródskórnego testu tuberkulinowego u krowy z wynikiem dodatnim testu Bovigam® nie może być podstawą uznania jej za zakażoną. Prawdopodobnie wynik następnego tuberkulinizacji takiej krowy będzie dodatni. Okres między zakażeniem a dodatnim

wynikiem testu Bovigam jest w dużym stopniu niezależny od dawki zakażającej *M. bovis* (18). Na wyniki obydwu testów może mieć wpływ supresja odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego na tuberkulinę (anergia).

### Zalety testu gamma-interferonowego

- Czułość testu jest zbliżona do czułości pojedynczej tuberkulinizacji i nieco wyższa w stosunku do tuberkulinizacji porównawczej.
- Czas od zakażenia niezbędny do wykrycia IFN- $\gamma$  jest krótki i wynosi od 1 do 5 tygodni. Test wykrywa zakażenie po 3 do 6 tygodni od wnikięcia prątków).
- Test może być powtórzony po krótkim czasie, bowiem nie wpływa na układ odpornościowy. Pozwala to na jego kolejne wykonanie, jeszcze przed wyznaczonym terminem tuberkulinizacji. W tym kontekście należy podkreślić, że tuberkulinizacja, którą wykonywanoby przed pobraniem krwi do testu gamma-interferonowego, mogłaby wpłynąć na jego wynik.
- Nie wymaga, jak test tuberkulinowy, ponownego przyjazdu do zwierzęcia.
- Pozwala w pełni na obiektywną interpretację wyniku. Wynik wyrażany jest w jednostkach gęstości optycznej (OD).
- Eliminuje wiele praktycznych problemów towarzyszących tuberkulinizacji (np. trudności wykonania testu, błędy przy jej wykonaniu, oszustwo), prowadzących do niewykrycia zakażenia.
- Umożliwia odróżnienia zakażenia *M. bovis* od skutków szczepienia *M. bovis* – BCG.

### Wady testu gamma-interferonowego

- Pewna niewielka liczba krów zakażonych *M. bovis* reagujących dodatnio w śródskórnym teście tuberkulinowym nie jest wykrywana w teście gamma-interferonowym (27).
- Młode niezakażone bydło reaguje nieswoiście. Jest to prawdopodobnie spowodowane tym, że ich komórki NK krwi obwodowej wytwarzają IFN- $\gamma$  pod wpływem stymulacji *in vitro* antygenami prątków gruźlicy (37, 41).
- Trudności związane z utrzymaniem próbek krwi w oborze w temp. 10–26°C, a także nieprzeprowadzenie inkubacji z antygenem w ciągu kilku godzin po pobraniu próbek krwi, mogą znacząco obniżyć czułość testu (38, 39, 40, 42, 43). Niektóre czynniki immunosupresji odporności komórkowej i czułość testu skórznego mogą także mieć wpływ na wynik testu gamma-interferonowego (tab.1; 24).

### Wpływ śródskórnego testu tuberkulinowego na wynik testu gamma-interferonowego

Jak już wspomniano, stwierdzono wpływ uprzednio wykonanej tuberkulinizacji na wynik testu gamma-interferonowego. Obserwowano stopniowy wzrost wartości gęstości optycznej pomiędzy 7 i 59 dniem po tuberkulinizacji. Wielokrotnie jednak uzyskiwano sprzeczne wyniki, które były konsekwencją prowadzenia badań w różnych warunkach środowiskowych i na różnym materiale zwierzęcym (14). Badacze oceniali Bovigam® u naturalnie zakażonych krów pomiędzy 8 a 28 dniem po tuberkulinizacji. Stwierdzili, że test Bovigam® może być stosowany bezpiecznie po 8 dniach od odczytu tuberkulinizacji. Wyniki te stały się podstawą protokołu do badań w Nowej Zelandii, według którego krew do testu Bovigam® pobiera się od 13 dnia po tuberkulinizacji. W USA wprowadzono możliwość wykonania testu Bovigam® od 3 dnia po tuberkulinizacji. W Wielkiej Brytanii u cieląt zakażonych dużymi dawkami *M. bovis* wykazano znaczące obniżenie koncentracji IFN- $\gamma$  w 3 dni po tuberkulinizacji porównawczej. Mimo to nie stwierdzono wpływu tuberkuliny bydłowej i ptasiej na wyniki testu (38). W innych badaniach na cielętach wykazano przejściowy wzrost koncentracji IFN- $\gamma$  w reakcji na tuberkulinę ptasią w tydzień po tuberkulinizacji. Selektywne pobudzenie w reakcji na tuberkulinę ptasią może maskować zakażenia *M. bovis*.

Podsumowując wpływ tuberkulinizacji zakażonych zwierząt na poziom interferonu we krwi, należy stwierdzić, że:

- tuberkulinizacja u krów zakażonych *M. bovis* może stymulować pojawienie się IFN- $\gamma$  we krwi;
- tuberkulinizacja porównawcza nie wpływa znacząco na stymulację wytwarzania IFN- $\gamma$ ;
- krew do badań w teście Bovigam® może być pobrana najwcześniej w 3 dni po tuberkulinizacji i po 7 dniach od tuberkulinizacji porównawczej.

### Zastosowanie testu Bovigam® w praktyce

Swoistość testu Bovigam® z tuberkuliną PPD wynosi 96,6%. Jest więc tylko nieznacznie niższa od swoistości tuberkulinizacji porównawczej, która wynosi 99,5%. W krajach lub regionach o niskim odsetku zakażeń jego zastosowanie może prowadzić do eliminacji stosunkowo wysokiej liczby zwierząt niezakażonych (39). Jest to główny argument przeciwko masowemu stosowaniu testu Bovigam® w badaniach przesiewowych. Ponadto koszty jego stosowania

# PRODUKTY KONFEKCJONOWANE

## ESTETYKA PROFESJONALIZM FARMACEUTYCZNE OPAKOWANIA



### PROPIONIAN SODU



### SIARCZAN MAGNEZU



### OLEJ PARAFINOWY

### KWAS MLEKOWY

Przyjmę zlecenie na konfekcję od 100 - 1000 g.

Producent:



07-410 Ostrołęka ul. Targowa 41  
tel./faks 029 767 87 41  
e-mail: biuro@jfarm.pl  
www.jfarm.pl



są nieco wyższe od ponoszonych na tuberkulinizację. Zdarza się również, że nie potwierdza zakażeń wykrytych tuberkulinowym testem śródskórnym. Najbardziej wskazane jest jego równoległe stosowanie ze śródskórnym testem tuberkulinowym, zwłaszcza w przypadku niezrozumiałego wzrostu liczby zakażeń lub utrzymującego się zakażenia stada mimo prowadzonej tuberkulinizacji (25, 40). Zastosowanie obydwu testów może podnieść diagnostyczną czułość nawet o 20% w stosunku do pojedynczej tuberkulinizacji i prowadzi do usunięcia większej liczby zwierząt z zakażonego stada. W USA test gamma-interferonowy jest zatwierdzony od 2001 r. jako metoda uzupełniająca diagnostykę gruźlicy bydła. Obecnie test ten może być stosowany do potwierdzenia statusu stada wolnego, po wykonaniu kilku tuberkulinizacji, jako alternatywa w stosunku do tuberkulinizacji porównawczej. Jest także dopuszczony jako test równoległy z pojedynczą tuberkulinizacją w stadach zakażonych. W Nowej Zelandii jest dopuszczony do stosowania u bydła, jako uzupełniający test tuberkulinowy, zarówno u zwierząt reagujących w teście skórnym, jak również równoległe u zwierząt reagujących ujemnie w stadach zakażonych. Test ten jest używany także przy przerzutach zwierząt ze stad zakażonych do wolnych, w których używany jest tylko śródskórny test tuberkulinowy. W Nowej Zelandii w latach 2004/2005 test gamma-interferonowy wykonano u około 6500 zwierząt reagujących dodatnio w tuberkulinizacji i około 18 200 reagujących ujemnie, co stanowiło około 0,5% ogółu bydła badanego w tym okresie. Do równoległego badania jest używany standardowy test Bovigam, podczas gdy do ponownego badania zwierząt reagujących dodatnio w odczynie tuberkulinizacji używany jest standardowy test Bovigam® lub jego wersja zmodyfikowana ze zwiększoną swoistością (15). W lipcu 2002 r. test gamma-interferonowy został formalnie uznany w Unii Europejskiej jako równoległy uzupełniający, umożliwiający wykrycie największej liczby zwierząt zakażonych. Test ten jest obecnie stosowany jako standardowy w krajach Unii Europejskiej, w których endemicznie występuje gruźlica bydła, np. w Irlandii (7000 badań rocznie), we Włoszech, w Hiszpanii i Wielkiej Brytanii (13 900 badań w 2005 r.).

### Diagnostyka serologiczna

Gruźlica bydła jest chorobą, w której utrzymuje się pewna równowaga pomiędzy odpornością komórkową i humoralną. U zwierząt anergicznym może być przydatna diagnostyka serologiczna polegająca na wykrywaniu przeciwciał (42). Zastosowanie znajduje głównie test ELISA,

który ciągle jest doskonalony. Metody serologiczne mogą być zalecane jako alternatywne w stosunku do tuberkulinizacji czy testu interferonowego.

### Inne testy diagnostyczne

Podstawę diagnostyki gruźlicy u bydła stanowi nadal izolacja prątka z materiału uzyskanego od zwierząt oraz ze środowiska. Coraz częściej zastosowanie znajdują również metody molekularne. Obecnie dostępne są zestawy komercyjne PCR (do reakcji łańcuchowej polimerazy) do diagnostyki gruźlicy płuc u ludzi (43). Wprowadzono również test PCR do identyfikacji *M. bovis* w materiale od zwierząt (44). Umożliwia on badanie próbek uzyskanych przyżywcio, a także monitorowanie środowiska. Fałszywie ujemne wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu tej metody wynikają prawdopodobnie ze zbyt małej liczby bakterii w materiale lub obecności w nim inhibitorów. Wydaje się, że metoda ta będzie przydatna do diagnozowania zakażeń we wczesnych stadiach rozwoju.

Przyszłość diagnostyki laboratoryjnej upatrywana jest w uzyskaniu swoistych i syntetycznych antygenów jako alternatywnych w stosunku do tuberkuliny PPD. Poznanie sekwencji genów *M. tuberculosis*, *M. bovis* i *M. bovis* BCG stwarza możliwość podniesienia czułości i swoistości testu gamma-interferonowego.

### Piśmiennictwo

- Ritacco V., Lopez B., De Kantor I.N., Barrera L., Errico F., Nader A.: Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sc.* 1991, **50**, 365-367.
- Neill S.D., Bryson D.B., Pollock J.M.: Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 2001, **81**, 79-86.
- Welsh D.M., Cunningham R.T., Corbett D.M., Girvin R.M., McNair J., Skuce R.A., Bryson D.G., Pollock J.M.: Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral responses in bovine tuberculosis. *Immunology* 2005, **114**, 101-111.
- Rothel J.S., Jones S.L., Corner L.A., Cox J.C., Wood P.R.: A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 1990, **67**, 134-137.
- Morris R.S., Pfeiffer D.U., Jackson R.: The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol.* 1994, **40**, 153-177.
- Hanna J., Neill S.D., O'Brien J.J.: ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 1992, **31**, 243-249.
- Griffin J.M., Williams D.H., Kelly G.E., Clegg T.A., O'Boyle L., Collins J.D., More S. J.: The impact of badger removal on the control of tuberculosis in cattle herds in Ireland. *Prev. Vet. Med.* 2005, **67**, 237-266.
- Surujballi O.P., Romanowska A., Sugden E.A., Turcotte C., Jolley M.E.: A Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in sera. *Vet. Microbiol.* 2002, **87**, 149-157.
- Fend R., Geddes R., Lesllier S., Vordermeier H.M., Corner L.A.L., Gormley E., Costello E., Hewinson R.G., Marlin D.J., Woodman A.C., Chambers M.A.: Use of an electronic nose to diagnose *Mycobacterium bovis* infection in badgers and cattle. *J. Clin. Microbiol.* 2005, **43**, 1745-1751.
- Delahay R.J., Cheeseman C.L., Clifton-Hadley R.S.: Wildlife disease reservoirs: the epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in the European badger (*Meles meles*) and other British mammals. *Tuberculosis* 2001, **81**, 43-49.

- Inwald J., Hinds J., Palmer S., Dale J., Butcher P., Hewinson R.G., Gordon S.V.: *J. Clin. Microbiol.* 2003, **41**, 3929-3932.
- Snider D.E.: The tuberculin test. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1982, **125**, 108-118.
- Monaghan M., Doherty M.I., Collins J.D., Kazda J.F., Quinn P.I.: The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 1994, **40**, 33-43.
- Ryan T.J., Buddle B.M., de Lisle G.W.: An evaluation of the gamma-interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin test. *Res. Vet. Sci.* 2000, **69**, 57-61.
- Buddle B.M., Ryan T.J., Pollock J. M., Andersen P., de Lisle G.W.: Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet. Microbiol.* 2001, **80**, 37-46.
- Norby B., Bartlett P.C., Fitzgerald S.D., Granger L.M., Brunning-Fann C.S., Whipple D.L., Payeur J. B.: The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2004, **16**, 126-131.
- Kleeberg H.H.: The tuberculin test in cattle. *J. South Afr. Vet. Med. Assoc.* 1960, **31**, 213-225.
- Dean G.S., Rhodes S.G., Coad M., Whelan A.O., Cockle P.J., Clifford D.J., Hewinson R.G., Vordermeier H.M.: Minimum infective dose of *M. bovis* in cattle. *Inf. Immun.* 2005, **73**, 6467-6471.
- Clifton-Hadley R. S., Goodchild A.V.: The fall and rise of bovine tuberculosis in Great Britain. W: Thoen C.O., Steele J.H., Gilsdorf M.F. (edit.). *Mycobacterium bovis Infection in Animals and Humans*. Blackwell, New York 2005.
- Charleston B., Hope J.C., Carr B. W., Howard C.J.: Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves actually infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 2001, **149**, 481-484.
- Doherty M.L., Monaghan M.I., Basset H.F., Quinn P.J.: Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnosis tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Res. Vet. Sc.* 1995, **58**, 211-217.
- Costello E., Egan J.W.A., Quigley F.C., O'Reilly P.F.: Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. *Vet. Rec.* 1997, **141**, 222-224.
- Thom M., Morgan J.H., Hope J.C., Villareal-Ramos B., Martin M., Howard C.J.: The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004, **102**, 399-412.
- Hope J.C., Thom M.L., Villareal-Ramos B., Vordermeier H.M., Hewinson R.G., Howard C.J.: Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clin. Exp. Immunol.* 2005, **141**, 432-439.
- Pollock J.M., Welsh M.D., McNair J.: Immune response in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005, **108**, 37-43.
- Goodchild A.V., Clifton-Hadley R.S.: Cattle to cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* 2001, **81**, 23-41.
- Pollock J.M., Neill S.D.: *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 2002, **163**, 115-127.
- Vordermeier M., Goodchild A., Clifton-Hadley R., de la Rua R.: The interferon gamma field trial: background, principles and progress. *Vet. Rec.* 2004, **155**, 37-38.
- Wood P.R., Corner L.A., Rothel J.S., Baldock C., Jones S.L., Cousins D.B., McCormick S., Francis B.R., Creeper J., Tweedle N.P.: Field comparison of the interferon-gamma assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 1991, **68**, 286-290.
- Wood P.R., Jones S.L.: Bovigam: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2001, **81**, 147-155.
- Tweedle N.E., Livingstone P.: Bovine tuberculosis control and eradication program in Australia and New Zealand. *Vet. Microbiol.* 1994, **40**, 23-39.
- Malone F.E., Wilson E.C., Pollock J.M., Skuce R.A.: Investigations into an outbreak of tuberculosis in a flock of sheep in contact with tuberculous cattle. *J. Vet. Med. B.* 2003, **50**, 500-504.
- Grobler D.G., Michel A.L., De Klerk L.M., Bengis R.G.: The gamma-interferon test: its usefulness in a bovine tuberculosis survey in African buffaloes (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park. *Onderst. J. Vet. Res.* 2002, **69**, 221-227.
- Katial R.K., Hershey J., Prohit-Seth T., Belisle J.T., Brennan P.J., Spencer J.S., Engler R. J. M.: Cell-mediated immune response to tuberculosis antigens: comparison of skin testing and measurement of in vitro gamma inter-

- feron production in whole-blood culture. *Clin. & Diag. Lab. Immunol.* 2001, **8**, 339-345.
35. Britton W.J., Gilbert G.L., Wheatley J., Leslie D., Rothel J.S., Jones S.L., Bradley P.: Sensivity of human gamma interferon assay and tuberculin testing for detecting infection with *Mycobacterium tuberculosis* in patients with culture positive tuberculosis. *Tuberculosis* 2005, **85**, 137-145.
36. Neill S. D., Cassidy J., Mackie D.P., Pollock M., Clements A., Walton E., Bryson D.G.: Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet. Rec.* 1994, **135**, 134-135.
37. Olsen I., Boysen P., Kulberg S. Hope J.C., Jungersen C., Storeset A.K.: Bovine NK cells can produce gamma-interferon in response to the secrete mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Inf. Immun.* 2005, **73**, 5628-5635.
38. Whelan A.O., Coad M., Peck Z.A.A., Clifford D., Hewinson R.G., Vordermeier H.M.: Influence of skin testing and overnight sample storage on blood-based diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet. Rec.* 2004, **155**, 204-206.
39. Pollock J.M., Buddle B.M., Andersen P.: Towards more accurate diagnosis of bovine tuberculosis using defined antigens. *Tuberculosis* 2001, **81**, 65-69.
40. Pollock J.M., Girvin R.M., Lightbody K.A., Clements R.A., Neill S.D., Buddle B.M., Andersen P.: Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. *Vet. Rec.* 2000, **146**, 659-665.
41. De la Rua-Domenech R., Goodchild A.T., Vordermeier H.M., Hewison R. G., Christiansen K.H., Clifton-Hadley R.S.: Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin test,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sc.* 2006, **81**, 190-210.
42. Yearsley D., Egan J., Costello E., O'Reilly P., Hewinson R.G.: An evaluation of an anamnestic ELISA for the detection of tuberculous cattle. *Irish Vet. J.* 1998, **51**, 303-306.
43. Drobniowski F.A., CAW M., Gibson A., Young D.: Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Inf. Dis.* 2003, **3**, 141-147.
44. Sreedevi B., Krishnappa G.: Standardization of polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms from bovine. *Ind. J. Anim Sci.* 2004, **74**, 1120-1123.

---

Prof. dr hab. Jerzy Kita, Katedra Nauk Klinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa